

Klinik und Praxis. Urban u. Schwarzenberg, München-Berlin (1962). — 13. KORNGOLD, L. und R. LIPARI, Science (Washington) 121, 170 (1955). — 14. HITZIG, W. H., Die Plasmaproteine in der klinischen Medizin. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963).

— 15. LINDGREN, F. T. und A. V. NICHOLS, in: The Plasma Proteins, Vol. 2, S. 2, Hrsg. F. W. PUTNAM, Academic Press New York u. London (1960). — 16. NIKKILÄ, E., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5, 1 (1953).

Prof. Dr. F. Scheiffarth

Abteilung für klinische Immunologie des
Universitätskrankenhauses

852 Erlangen, Krankenhausstr. 12

Isoenzyme von Lactat-Dehydrogenase im Sternalmark- und Venenblutserum bei inneren Krankheiten¹⁾

Von Z. CHURÝ, J. TOVÁREK und J. VOJTKOVÁ

Aus dem Institut für Pathologische Physiologie (Direktor: Prof. Dr. J. VASKU) und der 3. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. Dr. J. POJER) der Purkyně-Universität Brno, Tschechoslowakei

(Eingegangen am 11. Mai 1966)

Es wird über vergleichende Untersuchungen von Lactat-Dehydrogenase und deren Isoenzymen im Serum des Knochenmarks und des venösen Blutes bei 44 hämatologischen und internistischen Patienten berichtet. Bei 10 Patienten wurden auch die Isoenzyme in den Erythrocyten und kernhaltigen Zellen aus dem Knochenmark untersucht. In Seren des Knochenmarks wurden höhere Aktivitäten der LDH und deren Isoenzyme, besonders von LDH₃ bis LDH₅ gefunden. Diese Konzentrationszunahme war dem Grad der Hämolyse nicht streng proportional. Bei einigen Patienten, bei welchen die Knochenmarksseren ganz klar und nicht hämolytisch waren, waren die Aktivitäten von LDH und auch LDH₃ bis LDH₅ größer als in venösen Seren desselben Patienten. Die Autoren sind deshalb der Meinung, daß diese Aktivitätszunahme nicht nur aus den hämolytierten Erythrocyten, sondern auch aus den kernhaltigen Knochenmarkszellen stammte.

Comparative studies are reported on lactate dehydrogenase and its isoenzymes in the serum of bone marrow and venous blood from 44 haematological and internal patients. The isoenzymes in the erythrocytes and nucleated cells from the bone marrow from 10 patients were also studied. The serum of bone marrow contained higher activities of LDH and its isoenzymes, especially LDH₃, LDH₄ and LDH₅. There was no strict proportionality between the increase in concentration and the degree of hemolysis. In some cases, where the bone marrow serum was clear and non-hemolytic, the activities of LDH, LDH₃, LDH₄ and LDH₅ were higher than in the venous serum of the same patients. We therefore believe that this increase in activity not only arises from the hemolysed erythrocytes, but also from the nucleated bone marrow cells.

Bei dem heutigen Aufschwung der klinischen Enzymologie ist es erstaunlich, wie wenig Aufmerksamkeit man der Untersuchung von Enzymen im Serum des Knochenmarks widmet, wenn auch einige Ergebnisse bezeugen, daß wenigstens ein Teil der Serumenzyme bei einigen Erkrankungen (1) aus dem KM in das periphere Blut ausgeschwemmt werden dürfte. HELLER und Mitarb. (2) berichteten über die Erhöhung von einigen Enzymen einschließlich Lactat-Dehydrogenase^{2, 3)} im Plasma des KM von 4 Patienten mit posthämorrhagischer Anämie und noch höhere Aktivitäten bei einem Patienten mit megaloblastischer Anämie. Auch wir (3) beobachteten bei 20 Patienten (15 mit hämatologischen und 5 mit inneren Erkrankungen) eine über die Norm des venösen Serums erhöhte Aktivität von LDH im Serum des KM. Wir vermuteten deshalb, daß minde-

stens ein Teil der Serumenzyme aus dem KM stammen dürfte. Auch die Aktivitäten von Glutamat-Pyruvat- und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Aldolase, Phosphohexoisomerase und Malat-Dehydrogenase waren im Serum des KM bei unseren Patienten erhöht. RICHTER und KÖHLER (4) fanden bei 16 hämatologischen und 36 internistischen Patienten die Erhöhung von Enzymen bei einigen Patienten im Serum des KM. Die Erhöhung war für Lactatdehydrogenase, Malatdehydrogenase und Alkalische Phosphatase verglichen mit den Aktivitäten im venösen Serum statistisch signifikant. Die Erhöhung der Aktivitäten von Enzymen im KM ist nach diesen Autoren durch mikro- oder makroskopische Hämolyse verursacht. ELLIOT und FLEMING (6) fanden bei Patienten ohne Anämie und bei Patienten mit megaloblastischer Anämie im Plasma des KM eine höhere Aktivität von LDH als im Serum. In der Zellfraktion des megaloblastären KM war die LDH-Aktivität höher als im normoblastischen KM. Sie sind deshalb der Meinung, daß die erhöhte Aktivität von Enzymen im venösen Serum aus hohen Enzymkonzentrationen im KM resultiert. Die LDH-Isoenzyme⁴⁾ wurden im KM nur wenig untersucht. PFLEIDERER und WACHSMUTH (7) untersuchten sie im Sektionsmaterial und reihen das KM nach dem Isoenzyimmuster in die Gruppe der Organe, die

¹⁾ Teilergebnisse wurden vorgetragen auf der Arbeitsversammlung der Hämatologischen Gesellschaft vom 12.—13. November 1965 in Ostrava (5).

²⁾ Der Trivialname Lactat-Dehydrogenase wird hier gebraucht für das Enzym L-Lactat: NAD Oxydoreduktase, EC 1.1.1.27, Glutamat-Pyruvat-Transaminase für L-Alanin: α -Oxoglutarat Aminotransferase, EC 2.6.1.2, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase für L-Aspartat: α -Oxoglutarat Aminotransferase, EC 2.6.1.1, Aldolase für: Fructose-1,6-Diphosphat D-Glyceraldehyd-3-Phosphatlyase, EC 4.1.2.7, Phosphohexoisomerase für D-Glucose-6-phosphat Ketol-Isomerase, EC 5.3.1.9, Malatdehydrogenase für L-Malat: NAD Oxydoreduktase, EC 1.1.1.37.

³⁾ Abkürzungen: LDH = Lactat-Dehydrogenase, KM = Knochenmark.

⁴⁾ Die schnellste anodische Fraktion nennen wir LDH₁ = H-Typ von CAHN und Mitarb. oder B-Typ von MARKERT und APPELLA, die kathodische Fraktion LDH₅ = M-Typ oder A-Typ.

durch die größte Aktivität von LDH₃ und etwas niedrigere von LDH₂ und LDH₄ charakterisiert sind. YAKULIS und Mitarb. (8) untersuchten LDH-Isoenzyme in der Zellfraktion des KM und fanden im Vergleich zum venösen Serum derselben Patienten höhere Aktivitäten von LDH₂ und LDH₃, eventuell auch LDH₄. Bei erythroblastischer Hyperplasie des KM nach Blutverlust enthalten LDH₂ und LDH₃ etwa 60% der gesamten LDH Aktivität, LDH₁ nur 20%. In der Zellfraktion des megaloblastischen KM ist im Gegensatz dazu LDH₁ am aktivsten. Bei der chronischen myeloischen und lymphatischen Leukämie sind LDH₂, ₃, ₄ am aktivsten, aber auch LDH₅ ist relativ aktiv, was zu den Befunden bei normalen Leukocyten im Gegensatz steht, in denen die aktivsten Isoenzyme LDH₂ und LDH₃ sind und LDH₅ nur wenig aktiv ist (9). Nach neuesten Untersuchungen haben aber isolierte normale Granulocyten die größte Aktivität in LDH₅ (10, 5).

In dieser Arbeit wollen wir untersuchen, ob es mit Hilfe der LDH-Isoenzym-Untersuchung möglich ist, die Herkunft der LDH-Erhöhung im Serum des KM zu identifizieren.

Methodik

LDH und deren Isoenzyme haben wir bei 44 Patienten mit hämatologischen und inneren Krankheiten untersucht.

Knochenmark aspirierten wir aus dem *Sternum* in eine trockene Injektionsspritze. Nach Aspiration der ersten Tropfen unterbrachen wir die Aspiration, strichen die Abstriche auf Objektträgern aus und aspirierten dann weiter einige ml/KM-Inhalt. Bei 10 Patienten aspirierten wir noch einige ml in 500 I. E. Heparin Novo. Gleichzeitig entnahmen wir 5 ml Venenblut aus der *V. cubitalis*. Nach der Gerinnung trennten wir das Serum des KM und Venenblutes durch Zentrifugation ab. Die Seren verarbeiteten wir am selben Tage oder nach Lagerung bei 4° am nächsten Tag.

Die Aktivität der LDH bestimmten wir mit der kolorimetrischen Methode nach ŠEVELA und TOVÁREK (14) und geben die Aktivität in $\mu\text{Mol/Min./l}$ Serum an. Die Aktivität von LDH im normalen menschlichen Serum beträgt nach dieser Methode $121,7 \pm 20 \mu\text{Mol/Min./l}$.

Hämoglobin im Serum untersuchten wir nach BEAU (12) mit o-Tolidin. Die **elektrophoretische Trennung von LDH** führten wir in Agar nach WIEME (13) durch. Nach der Trennung wurden die Präparate nach VAN DER HELM (14) gefärbt, indem wir als Substrat Natriumlactat und NAD benutzten und Phenazinmethosulfat und Nitroblautetrazoliumchlorid in das Inkubationsgemisch gegeben haben. Die Integrationsbewertung von Isoenzymen wurde im Spektralphotometer UFD Vitatron durchgeführt. Heparinisiertes Knochenmarksblood verdünnten wir mit 0,2 Vol. Subtosan Specia und ließen es bis zur Trennung der Erythrocyten im Thermostat stehen. Das Plasma mit kernhaltigen Knochenmarkszellen verarbeiteten wir weiter nach YAKULIS (8). Erythrocyten hämolysierten wir nach dreimaligem Waschen mit kalter 0,9proz. NaCl-Lösung mit Hilfe von Digitonin. Nach 1stdg. Stehen bei 4° haben wir das Stroma durch Zentrifugation (3000 U./Min.) abgetrennt und im klaren Hämolysat die LDH-Isoenzyme untersucht.

In Abstrichen des KM zählten wir die Mitosen auf 1000 Zellen, die Zahl der nackten Kerne und der Zellen, deren Zytoplasma oder Kern beschädigt waren. Die Beurteilung von geschädigten Zellen

war streng und die Zahl dieser Zellen ist deshalb bei einigen Patienten relativ groß (Tab. 1).

Die **statistische Signifikanz** überprüften wir nach dem t-Test. Die Beziehungen zwischen dem Hämoglobin des KM- und Venen-Serums, der Zahl der Mitosen und geschädigten Zellen einerseits und den Aktivitäten von LDH und deren Isoenzymen andererseits überprüften wir mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten.

Ergebnisse

Die LDH-Aktivität war, bis auf einen Fall, im Serum des KM immer höher als im Serum des Venenblutes desselben Patienten. Bei 4 Patienten war die LDH-Aktivität im Serum des KM in den Grenzen der normalen Aktivität des venösen Blutes, d. h. unter $161,7 \mu\text{Mol/Min./l}$, sie lag aber auch höher als die LDH-Aktivität des venösen Serums desselben Patienten. Der Durchschnitt der LDH-Aktivitäten im KM lag statistisch signifikant höher als der Durchschnitt der LDH-Aktivitäten im venösen Serum. Die Seren von KM waren aber 27mal sichtbar hämolytisch, 3mal ikterisch und die venösen Sera 4mal sichtbar hämolytisch und 3mal ikterisch. Bei 3 Patienten war das Hämoglobin im venösen Serum spektroskopisch höher als im Serum des KM und bei einem Patienten etwa gleich hoch. Aber auch bei diesen Patienten war die LDH-Aktivität im KM höher als im venösen Serum. Die durchschnittlichen Werte von Hämoglobin im Serum des KM waren höher als im Serum des Venenblutes, die Streuung der Werte war aber so groß, daß der Unterschied nicht signifikant war. Die relativen Isoenzym-Werte von LDH₁ und LDH₂ im Serum des KM sind niedriger als im Serum des Venenblutes (Tab. 1), während LDH₃ bis auf einmal, LDH₄ bis auf 7mal und LDH₅ bis auf 12mal im Serum des KM höher als im venösen Serum desselben Patienten waren. Das ist auch aus den Durchschnittswerten (Abb. 1) zu

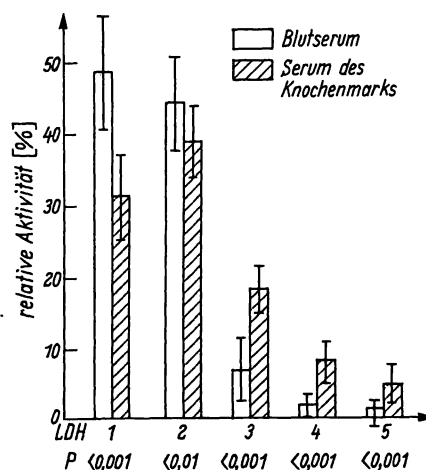


Abb. 1

Vergleich der relativen Aktivitäten der LDH-Isoenzyme in Serum von Knochenmark und Venenblut

Tab. 1
Aktivitäten von LDH und relative Aktivitäten der LDH-Isoenzyme im Serum von Knochenmark und Venenblut

	LDH $\mu\text{Mol/Min./l}$	LDH ₁ %	LDH ₂ %	LDH ₃ %	LDH ₄ %	LDH ₅ %	Hb mg/100 ml	beschädigte Zellen in %
Serum des Knochenmarks	330 $\pm 198,3$	31,6 $\pm 10,0$	38,5 $\pm 8,5$	18,1 $\pm 5,8$	7,2 $\pm 5,3$	4,4 $\pm 4,6$	241,3 $\pm 263,6$	14,3 $\pm 6,2$
Venen Serum	125 $\pm 121,7$	43,0 $\pm 10,8$	44,2 $\pm 9,6$	9,7 $\pm 5,5$	1,7 $\pm 2,8$	1,2 $\pm 2,9$	45,6 $\pm 46,0$	—

sehen. Die Differenzen zwischen KM und Venenblut sind statistisch signifikant. Die Erhöhung von LDH₄ und LDH₅ war größer als die Erhöhung von LDH₃. Wenn wir die Aktivitäten von Isoenzymen in $\mu\text{Mol/Min./l}$ ausdrücken, so sind ihre Aktivitäten im Serum des KM, bis auf zwei Patienten, höher als im venösen Serum. Bei einer perniziösen Anämie (Abb. 2a) waren im venösen

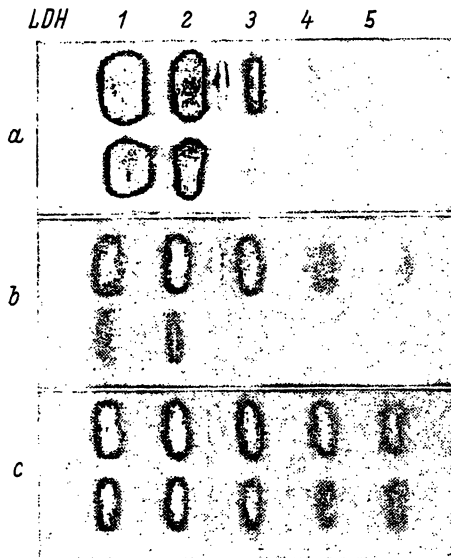


Abb. 2

Isoenzyme der LDH

a) bei perniziöser Anämie, b) bei Makroglobulinämie Waldenström, c) bei Hämangioendothelioma hepatis. Oben: Serum des Knochenmarks, unten: Serum des Venenblutes

Serum LDH und deshalb auch LDH₁ und LDH₃ unerwartet ein wenig höher als im Serum des KM. Auch bei einer Eisenmangelanämie lagen die Aktivitäten von LDH₁ und LDH₂ im venösen Serum höher als im Serum des KM. Diese Patientin hatte ungefähr die gleiche Hämolyse in den Seren von KM und Venenblut, trotzdem sind aber die LDH₄ und LDH₅ im Serum des KM aufgetreten (Abb. 3). Die Durchschnittsaktivitäten der Isoenzyme (Abb. 4) sind im Serum des KM statistisch

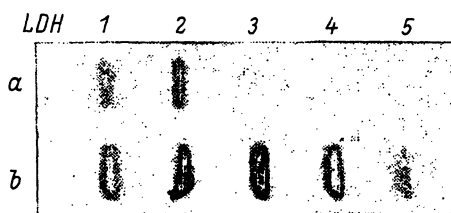


Abb. 3

Isoenzyme der LDH bei Eisenmangelanämie

Oben: Serum des Venenblutes, unten: Serum des Knochenmarks

signifikant höher als im Serum des Venenblutes. Die Erhöhung von LDH₃, LDH₄ und LDH₅ war dabei wesentlich größer als die Erhöhung von LDH₁ und LDH₂.

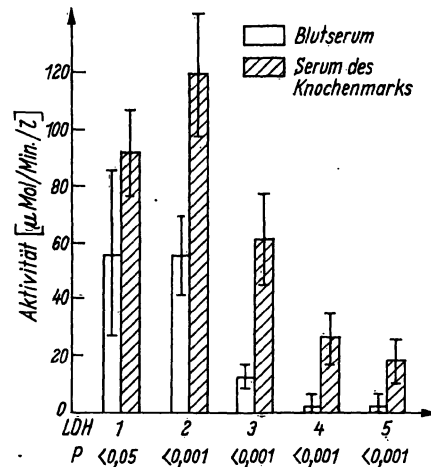


Abb. 4

Vergleich der absoluten Aktivitäten der LDH-Isoenzyme in Serum von Knochenmark und Venenblut

Eine niedrige Korrelation an den Grenzen der statistischen Signifikanz (Tab. 2) bestand zwischen den Hämoglobin-Werten und der LDH- und LDH₁-Aktivität im Serum des KM, niedrige Korrelation zwischen der Zahl der Mitosen der KM-Zellen und die geringste zwischen der Zahl der geschädigten KM-Zellen und den Aktivitäten der Isoenzyme. Bei 3 Patienten, bei welchen die Sera des KM ganz klar waren und weniger Hämoglobin als venöses Serum enthielten, waren LDH₃, LDH₄ und LDH₅ im Serum des KM auch höher als im venösen Serum.

In den Erythrocyten aus dem KM überwogen die Isoenzyme LDH₁ und LDH₂, LDH₃ war auch relativ aktiv, während LDH₄ und LDH₅ nur in Spuren anwesend waren (Abb. 5, Tab. 3). In der kernhaltigen KM-Fraktion, die die myeloischen und erythroblastischen Zellen enthält, überwogen LDH₂ und LDH₃ und bei 3 Patienten (chron. lymphatische Leukämie, Lymphogranulomatosis maligna und Asthma bronchiale mit Eosinophilie) überwog die LDH₅ (Abb. 6).

Diskussion

Bei dem Vergleich der Isoenzyme von LDH in Seren des KM und Venenblutes lassen sich im Serum des KM höhere Aktivitäten der gesamten LDH und deren Isoenzyme erkennen. Unsere Versuche ergeben, daß die erhöhte

Tab. 2

Korrelationen zwischen den Aktivitäten von LDH und LDH-Isoenzymen und dem Hämoglobin sowie der Zahl der Mitosen und geschädigten Zellen in Abstrichen des Knochenmarks

Knochenmark	LDH	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
Hämoglobin	+ 0,27	+ 0,28	+ 0,07	+ 0,11	+ 0,20	+ 0,23
P	0,05 < P < 0,10	0,05 < P < 0,10	—	—	P > 0,10	P > 0,10
Mitosen	+ 0,14	+ 0,18	+ 0,08	+ 0,51	+ 0,08	+ 0,27
P	—	—	—	P > 0,10	—	—
geschädigte Zellen	— 0,09	+ 0,05	+ 0,05	+ 0,05	+ 0,09	+ 0,09
P	—	—	—	—	—	—
Serum von Venenblut						
Hämoglobin	+ 0,01	— 0,03	+ 0,04	+ 0,36	+ 0,03	+ 0,03
P	—	—	—	P < 0,05	—	—

Tab. 3
Relative Aktivitäten der LDH-Isoenzyme von kernhaltigen Zellen und Erythrocyten des Knochenmarks

		LDH ₁ %	LDH ₂ %	LDH ₃ %	LDH ₄ %	LDH ₅ %
kernhaltige Zellen		9,9	20,1	25,6	15,0	29,3
Erythrocyten	δ	± 6,0	± 4,1	± 8,9	± 3,7	± 11,7
		31,8	42,4	23,4	1,5	0,5
	δ	± 3,3	± 5,0	± 4,6	± 2,1	± 1,0

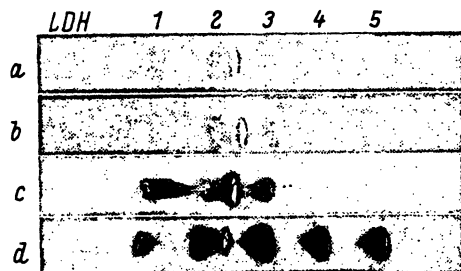


Abb. 5

Isoenzyme der LDH bei posthämorrhagischer Anämie

a) Serum des Venenblutes, b) Serum des Knochenmarks, c) Erythrocyten des Knochenmarks, d) kernhaltige Zellen des Knochenmarks



Abb. 6

Isoenzyme der LDH bei Asthma bronchiale mit Eosinophilie

a) Serum des Venenblutes, b) Serum des Knochenmarks, c) Erythrocyten des Knochenmarks, d) kernhaltige Zellen des Knochenmarks

Aktivität von LDH und Isoenzymen im Serum des KM teilweise durch Hämolyse bedingt ist. Es ist schon lange bekannt, daß Erythrocyten reich an LDH und LDH₁ und LDH₂ sind (15, 16, 7, 17, 9), und eventuell auch LDH₃ enthalten (8). Das hängt sicher vom Alter der Erythrocyten ab, denn je jünger sie sind, desto größere Aktivität haben sie in den hybriden Isoenzymen und LDH₅ (18, 19). Bei intravasalem Zerfall von Erythro-

cyten kommt es deshalb zur Erhöhung von LDH₁ und LDH₂ und der gesamten LDH im Serum (20, 21, 22, 8). KINGSLEY und Mitarb. (23) wiesen die Erhöhung der LDH, der thermostabilen LDH₁ und der thermisch indifferenten Fraktion im Serum und Plasma nach, wenn Hämolyse in vitro zugegeben wird. Die Erhöhung ist dem Grad der Hämolyse proportional.

Bei einigen unserer Patienten, bei welchen im Serum des KM keine Hämolyse nachweisbar war, waren trotzdem die LDH und deren Isoenzyme im KM-Serum höher als im venösen Serum. Die Erhöhung der LDH₃ bis LDH₅ zeigt, daß diese Isoenzyme eher aus anderen Zellen als aus den Erythrocyten stammen. Auch bei anderen unserer Patienten war die Erhöhung dieser Isoenzyme im KM-Serum relativ größer als die Erhöhung von LDH₁ und LDH₂. Die LDH₃ bis LDH₅ können ihre Herkunft in den Erythroblasten, in den myeloischen Zellen oder vielleicht auch in den anderen KM-Zellen haben, die reich an diesen Isoenzymen sind (24, 18, 19, 8). Auch unsere Untersuchungen bei 10 Patienten zeigen, daß die Erythrocyten aus dem KM reich an LDH₁ und LDH₂ sind, die kernhaltigen KM-Zellen dagegen an LDH₃ bis LDH₅ reich sind. Deshalb sind wir der Meinung, daß die Erhöhung von LDH₃ bis LDH₅ im Serum des KM und teils auch die gesamte LDH-Aktivität ihre Herkunft in den kernhaltigen KM-Zellen haben. Ob die LDH₃ bis LDH₅ aus der Schädigung der kernhaltigen KM-Zellen stammen, wogegen die sehr niedrige Korrelation zwischen beschädigten KM-Zellen in den Abstrichen und der LDH- und Isoenzym-Aktivität im Serum des KM spricht, oder bei deren mitotischer Aktivität freigegeben werden, was der Korrelation zwischen den Mitosen und LDH₃ entspräche, wagen wir bisher nicht zu sagen.

Literatur

1. AMELUNG, D., Dtsch. med. Wschr. 85, 1629 (1960).
2. HELLER, P., H. G. WEINSTEIN, M. WEST und H. J. ZIMMERMANN, Ann. Int. Med. 53, 898 (1960).
3. CHURÝ, Z. und J. TOVÁREK, Fol. haemat. 78, 71 (1961).
4. RICHTER, H. und W. KÖHLER, Klin. Wschr. 42, 1212 (1964).
5. DIUGUARDI, N., A. AGOSTINI und B. LOMATO, J. Laborat. Clin. Med., S. Louis, 61, 713 (1963).
6. ELLIOTT, B. A. und A. F. FLEMING, Brit. Med. J., 1, 626 (1965).
7. PFLEIDERER, G. und E. D. WACHSMUTH, Biochem. Z. 334, 185 (1961).
8. YAKULIS, V. J., C. W. GIBSON und P. HELLER, Amer. J. Clin. Path. 38, 378 (1962).
9. VESELL, E. S. und A. G. BEARN, J. Clin. Invest. 40, 586 (1961).
10. BOTTOMLEY, R. H., S. J. LOCKE und H. C. INGRAM, Blood 27, 85 (1966).
11. SEVELA, M. und J. TOVÁREK, Cas. lék. česk. 98, 844 (1959).
12. BEAU, A. F., Amer. J. Clin. Path. 32, 111 (1962).
13. WIEME, R. J., Clin. chimica Acta (Amsterdam) 4, 317 (1959).
14. VAN DER HELM, H. J., Clin. chimica Acta Amsterdam 7, 124 (1962).
15. AMELUNG, D., Dtsch. med. Wschr. 86, 731 (1961).
16. HESS, B. und S. I. WALTER, Klin. Wschr. 38, 1080 (1960).
17. VESELL, E. S. und A. G. BEARN, J. Clin. Invest. 37, 672 (1958).
18. STARKWEATHER, W. H., L. COUSINEAU, H. K. SCHOCH und C. J. ZARAFONETIS, Blood 26, 63 (1965).
19. VESELL, E. S. und A. G. BEARN, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N. Y. 111, 100 (1962).
20. CHURÝ, Z. und J. TOVÁREK, Scripta med. fac. brun. 37, 165 (1964).
21. WÖRNER, W., H. MARTIN und H. JUNGBLUTH, Med. Klin. 60, 496 (1965).
22. WRÓBLEWSKI, F. und K. F. GREGORY, Ann. N. Y. Acad. Sc. 94, 912 (1961).
23. KINGSLEY, D. P. E., J. COOK und A. E. VARTAN, Clin. chimica Acta (Amsterdam) 12, 489 (1965).
24. DIUGUARDI, N., A. AGOSTINI und G. FIORELLI, Enzym. biol. clin. 2, 116 (1962 bis 1963).

Doz. MUDr. Zdeněk Churý
Brno / Tschechoslowakei
Komenskýplatz 2